

PENGARUH KONSENTRASI INOKULUM DAN WAKTU FERMENTASI DALAM PRODUKSI BIOETANOL DARI RUMPUT LAUT *EUCHEUMA COTONII* DENGAN MENGGUNAKAN MIKROBA ASOSIASI

EFFECT OF INOCULUM CONCENTRATION AND TIME OF FERMENTATION IN PRODUCTION OF BIOETHANOL FROM EUCHEUMA COTTONII BY USING ASSOCIATION MICROBES

Edward Julys Dompeipen dan Maria Alexanderina Leha

Balai Riset dan Standardisasi Industri Ambon, Kementerian Perindustrian
Jl. Kebun Cengkeh Ambon, Maluku, Indonesia

E-mail : dompeipenedward@yahoo.com

Received: 16 Februari 2016; revised: 1 Maret 2016; accepted: 25 Maret 2016

ABSTRAK

Eksplorasi berbagai energi alternatif dari sumber daya alam yang dapat diperbaharui perlu dikembangkan. Sudah waktunya ketergantungan kebutuhan energi fosil *non-renewable* digantikan dengan energi *renewable*. Bioetanol menjadi pilihan utama karena mudah terurai dan aman bagi lingkungan karena tidak mencemari air dan hasil pembakarannya hanya menghasilkan karbondioksida dan air. Rumput laut jenis *Eucheuma cottonii* dapat dijadikan sebagai sumber bahan baku utama dalam pembuatan bioetanol. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi inokulum asosiasi mikroba, waktu fermentasi dan penentuan kadar etanol dalam produksi bioetanol dari rumput laut *Eucheuma cottonii*. Proses hidrolisis yang mengkonversi lignoselulosa dari rumput laut *Eucheuma cottonii* menjadi bioetanol dilakukan dengan menggunakan mikroba asosiasi yaitu; *Aspergillus niger*, *Zymomonas mobilis* dan *Saccharomyces cerevisiae* secara serempak. Metode penelitian yang dilakukan adalah variasi konsentrasi inokulum 5 mL; 10 mL; 15 mL; 20 mL; 25 mL dan waktu fermentasi 0 hari, 4 hari, 5 hari, 6 hari, 7 hari, 8 hari. Konsentrasi bioetanol hasil fermentasi yang tertinggi adalah 5,65% pada konsentrasi inokulum 15% dan waktu fermentasi 7 hari.

Kata kunci : Mikroba asosiasi, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Aspergillus niger*, Hidrolisis, Bioetanol

ABSTRACT

Exploration of a variety of alternative energy from natural resources that can be renewed should be developed. Nowadays dependence on non-renewable energy are replaced with renewable energy. Bioethanol is the main choice because easily biodegradable and safe for the environment, it does not pollute the water and its combustion produces only carbon dioxide and water. Eucheuma cottonii seaweed can be used as a source of raw material in the manufacture of bioethanol. This study was conducted to determine the effect of inoculum concentrations of associated microbial, time of fermentation and determining the concentration of ethanol in the production of bioethanol from seaweed Eucheuma cottonii. Hydrolysis process that converts lignocellulose from seaweed Eucheuma cottonii into bioethanol was conducted by using microbial associations, namely; Aspergillus niger, Zymomonas mobilis and Saccharomyces cerevisiae simultaneously. The research method is a variation of the concentration of inoculum 5 mL; 10 mL; 15 mL; 20 mL; 25 mL and the fermentation time 0 days, 4 days, 5 days, 6 days, 7 days, 8 days. The concentration of the highest ethanol fermentation results is 5.65% at a concentration of 15% inoculum and fermentation time of 7 days.

Key words : Association microbes, Saccharomyces cerevisiae, Zymomonas mobilis, Aspergillus niger, Bioethanol

PENDAHULUAN

Cadangan bahan bakar minyak Indonesia sangat terbatas, dewasa ini Indonesia hanya memiliki cadangan terbukti minyak 3,7 miliar barel atau 0,3% dari cadangan terbukti dunia (ESDM, 2012). Untuk mengurangi ketergantungan pada bahan bakar fosil, pemerintah

mengeluarkan Peraturan Presiden No.5 Tahun 2006 tentang kebijakan energi nasional untuk mendorong pengembangan sumber energi alternatif sebagai pengganti bahan bakar minyak. Pada tahun 2025 pemenuhan kebutuhan energi Indonesia diharapkan 17 % nya berasal dari energi baru terbarukan. Salah satunya dengan memanfaatkan etanol sebagai alternatif, khususnya bioetanol berbasis lignoselulosa.

Sintesis bioetanol dari biomassa terdiri dari dua tahap utama, yaitu hidrolisis dan fermentasi. Hidrolisis bertujuan untuk memecah polisakarida menjadi monosakarida. Polisakarida dapat diubah menjadi alkohol melalui proses biologi dan kimia. Proses hidrolisis dapat dilakukan dengan menggunakan enzim seperti selulase. Keuntungan dari hidrolisis dengan enzim adalah mengurangi penggunaan asam sehingga mengurangi dampak negatif terhadap lingkungan. Proses selanjutnya adalah fermentasi menggunakan jamur seperti *Sacchromyces cerevisiae* untuk dikonversi menjadi etanol (Broto 2010).

Makroalga merupakan salah satu organisme yang dapat dinilai ideal dan potensial untuk dijadikan sebagai bahan baku produksi biofuel (Gouveia dan Oliveira 2009). Secara kimia, rumput laut terdiri dari air (27,8%), protein (5,4%), karbohidrat (33,3%), lemak (8,6%), serat kasar (3%) dan abu (22,25%) (Harvey 2010). Rumput laut jenis *Eucheuma cottonii* merupakan salah satu rumput laut dari jenis alga merah (Rhodophyta). Rumput laut dapat dijadikan sebagai sumber bahan baku utama dalam pembuatan bioetanol (*biofuel*). Rumput laut *Eucheuma cottonii* memiliki komposisi penyusun seperti polisakarida yaitu selulosa, karaginan, agar, lignin dan monosakarida yaitu glukosa, galaktosa. (Sinuraya 2014).

Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh konsentrasi inokulum dan waktu fermentasi dalam produksi bioetanol dari rumput laut *Eucheuma cottonii*.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Rumput laut *Eucheuma cottonii*, *Zymomonas mobilis*, *Aspergillus niger* dan *Sacharomyces cerevisiae* glukosa 2 g, bakto agar 2 g, ekstrak tauge 20%, medium NA (nutrient agar), 0,10 g yeast extract; 0,05 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 8,50 g glukosa. 0,30 g KH_2PO_4 ; 0,35 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 8,50 g glukosa. 1,50 g, 0,30 g NPK; 0,35 g urea dan 18,50 gr glukosa. Crusher, inkubator, labu Erlenmeyer, otoklaf, Gas Kromatografi (GC).

Metode

Penelitian dilakukan secara eksperimental pada bulan Juni sampai dengan Desember 2014 di Laboratorium Kimia, Jurusan Kimia Politeknik Negeri Makassar dan Laboratorium Mikrobiologi, Balai Riset dan Standardisasi Industri Ambon. Pengambilan sampel rumput laut *Eucheuma cottonii* di Desa Letvuan, Kabupaten Maluku Tenggara.

Persiapan Bahan dan Perlakuan Awal

Rumput laut *Eucheuma cottonii* sebanyak 10 Kg direndam dengan larutan KOH 2% dalam wadah plastik tertutup sampai terendam, diaduk dan kemudian dibiarkan selama 24 jam pada suhu kamar. Rumput laut dicuci dengan akuades sampai lignin yang berwarna hitam keluar semua. Proses pencucian dihentikan setelah cairan pencuci sudah jernih atau pH netral. Rumput laut yang telah bersih dipotong-potong sepanjang 1 cm kemudian dijemur hingga kadar air dibawah 10%. Rumput laut dihaluskan dengan crusher dengan kehalusan 100 mesh. Selanjutnya dilakukan analisis selulosa dan lignin dilakukan dengan metode Chesson (Datta, 1981; Niken dan Bambang 2014).

Peremajaan Mikroba dengan Media Agar Miring

Glukosa 2 g, bakto agar 2 g dan ekstrak toge 20% dicampur kemudian dipanaskan sambil diaduk hingga larut. Beberapa tabung reaksi disiapkan, kemudian dipipet 10 mL larutan ekstrak dimasukkan kedalam tiap tabung reaksi, disumbat dengan kapas dan alumunium foil. Sterilisasi pada 121°C selama 15 menit lalu didinginkan dalam keadaan miring (media agar miring). Biakan murni *Aspergillus niger* dan *Sacharomyces cerevisiae* digoreskan secara zig-zag pada media agar miring dengan menggunakan jarum ose. Ditumbuhkan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 7 hari. Isolat *Zymomonas mobilis* diremajakan dalam tabung reaksi yang berisi medium NA (nutrien agar) miring dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam (Mahyati et al. 2013)

Pembuatan Media Inokulum (Starter)

Pembuatan media inokulum (*starter*) untuk ketiga mikroba *Zymomonas mobilis*, *Aspergillus niger* dan *Sacharomyces cerevisiae* dilakukan dalam media yang berbeda. Media starter untuk *Zymomonas mobilis* adalah 1,50 g tepung rumput laut; 0,10 g yeast extract; 0,05 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dan 18,50 g glukosa. Media starter untuk *Aspergillus niger* adalah 1,50 g tepung rumput laut; 0,30 g KH_2PO_4 ; 0,35 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; dan 18,50 g

Glukosa. Media starter untuk *Sacharomyces cerevisiae* adalah 1,50 g tepung rumput laut; 0,30 g NPK; 0,35 g Urea dan 18,50 g Glukosa. Masing-masing campuran bahan diatas dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 250 mL tambahkan 150 mL air, diaduk hingga larut. Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan aluminium foil lalu disterilkan dalam otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Dinginkan lalu tambahkan masing-masing kedalam Erlenmeyer stok kultur murni *Zymomonas mobilis*, *Aspergillus niger* dan *Sacharomyces cerevisiae* dengan menggunakan jarum ose dalam ruang sterilisasi. Ditutup kembali dengan kapas dan aluminium foil lalu difermentasi pada inkubator shaker selama 3 hari pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm (Mahyati et al. 2013).

Pembuatan Media Fermentasi

Pembuatan media fermentasi untuk ketiga mikroba *Zymomonas mobilis*, *Aspergillus niger* dan *Sacharomyces cerevisiae* dilakukan dalam media yang sama. Komposisi bahan untuk media fermentasi adalah 24,0 g tepung rumput laut; 1,00 g KH₂PO₄; 1,25 g (NH₄)₂SO₄; 1,00 g MgSO₄·7H₂O; 1,00 g CaCl₂; 1,00 g NaCl; 2,50 g ekstrak ragi; dan 62,50 g glukosa. Campuran bahan diatas dimasukkan kedalam beker gelas 2000 mL kemudian ditambahkan 400 mL air diaduk hingga larut. pH larutan diatur sampai 3,5 dengan buffer fospat lalu diencerkan hingga 500 mL (Mahyati et al, 2013). Disiapkan 20 buah Erlenmeyer 250 mL lalu ditambahkan 100 mL larutan kedalam tiap Erlenmeyer, disumbat dengan kapas dan aluminium foil dan disterilisasi dalam otoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Erlenmeyer dipindahkan kedalam ruang steril lalu tambahkan masing-masing (0 mL, 5 mL, 10 mL, 15 mL dan 20 mL) media inokulum *Aspergillus niger*, *Saccharymyces cerevisiae* dan *Zymomonas mobilis* kedalam setiap Erlenmeyer dengan menggunakan gelas ukur 25 mL yang steril. Erlenmeyer ditutup kembali dengan kapas lalu difermentasi pada *shaker incubator* selama 0 hari, 4 hari, 5 hari, 6 hari, 7 hari dan 8 hari pada suhu 29°C dengan kecepatan 150 rpm. Setiap Erlenmeyer pada media fermentasi diambil, disaring lalu didistilasi pada suhu 100°C hingga diperoleh volume destilat 10 mL. Destilat dianalisis dengan gas kromatografi.

Analisis Selulosa dan Lignin

Analisis selulosa dan lignin dilakukan dengan metode Chesson (Datta 1981; Niken dan Bambang 2014). Perhitungan kadar selulosa dan kadar lignin sebagai berikut :

$$Kadar\ Karaginan = \frac{(a-b)}{a} \times 100 \dots \dots \dots (1)$$

$$Kadar\ Hemiselulosa = \frac{(b-c)}{a} \times 100 \dots \dots \dots (2)$$

$$Kadar\ Selulosa = \frac{(c-d)}{a} \times 100 \dots \dots \dots (3)$$

$$Kadar\ Lignin = \frac{(d-e)}{a} \times 100 \dots \dots \dots (4)$$

Dimana :

A = berat sampel (gram)

b = berat residu pada penimbangan kedua (gram)

c = berat residu pada penimbangan ketiga (gram)

d = berat residu pada penimbangan keempat (gram)

e = berat abu (gram)

Pengukuran Kadar Etanol

Tabung destilasi dan labu gondok 250 mL disiapkan, selanjutnya 50 mL sampel cairan hasil fermentasi menggunakan labu ukur 50 mL dan dimasukkan ke dalam tabung destilasi. Didihkan dengan menghindari buih yang berlebihan, destilasi campuran alkohol dan air sampai dapat terkumpul 5 mL destilat. Piknometer diisi aquades destilasi dan ditutup. Piknometer dan aquades ditimbang, berat yang didapat adalah (W2). Kemudian Piknometer dikosongkan, aquades yang tersisa diabsorpsi dengan aseton. Tabung piknometer dikeringkan dalam oven. Piknometer yang telah kering kemudian ditimbang, berat yang didapat adalah (W1). Berat aquades (W) dihitung dengan cara W2 – W1. Distilat dipindahkan ke dalam gelas beker kering. Destilat dihomogenkan sebelum dimasukkan ke dalam Piknometer. Piknometer kering diisi dengan destilat, permukaan luar Piknometer dikeringkan dan ditimbang. Hasil yang didapat adalah (W3). Berat destilat adalah W3 – W1 = L. Berat air (L) dihitung dengan *specific gravity* atau *spg* = L/W. Nilai *spg* ditentukan menggunakan AOAC (*Association of Official Analitical Chemistry*) (Kusumaningati et al. 2013).

Penentuan Senyawa Bioetanol dengan Kromatografi Gas (KG)

Bioetanol dengan perlakuan konsentrasi inokulum mikroba asosiasi yang memproduksi bioetanol dengan kadar tertinggi, kemudian dikarakterisasi dengan menggunakan kromatografi gas (KG).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perlakuan Awal Sampel Rumput laut *Eucheuma cottonii*

Perlakuan awal biomassa lignoselulosa harus dilakukan untuk mendapatkan hasil yang tinggi, hal ini sangat penting untuk pengembangan teknologi biokonversi skala komersial (Mosier *et al.* 2005). Perlakuan awal dapat meningkatkan hasil glukosa yang diperoleh. Glukosa yang diperoleh tanpa perlakuan awal kurang dari 20%, sedangkan dengan perlakuan awal dapat meningkat menjadi 90% dari hasil teoritis (Hamelinck *et al.* 2005).

Tujuan perlakuan awal adalah untuk membuka struktur lignoselulosa agar selulosa menjadi lebih mudah diakses oleh enzim yang memecah polimer polisakarida menjadi monomer gula. Pencacahan dalam perlakuan awal dimaksudkan untuk memperkecil ukuran selulosa sehingga dapat berkontak secara efektif dengan katalis asam cair. Pencacahan dilakukan dengan menggunakan *crusher* sampai ukuran selulosa mencapai 60 mesh. Selulosa yang telah mencapai ukuran dikontakkan dengan katalis asam dengan menambahkan akuades sebagai zat cair pembawa untuk memudahkan kedua bahan (selulosa dan katalis) bercampur. Proses perlakuan awal dengan melakukan perendaman sampel rumput laut *Eucheuma cottonii* dalam larutan KOH 15% selama 24 jam bertujuan untuk melarutkan semua fraksi organik. Sampel kemudian dipotong sampai berukuran 1 cm dan selanjutnya dilakukan proses penepungan.

Analisis Lignin dan Selulosa pada *Eucheuma cottonii*

Proses atau teknologi konversi biomassa menjadi etanol dewasa ini sudah cukup mapan untuk biomassa penghasil karbohidrat jenis pati atau sukrosa, seperti ubi kayu, jagung, molasse, dan gula tebu. Untuk biomassa lignoselulosa, masalahnya menjadi agak berbeda karena didalam bahan berlignoselulosa terdapat senyawa lignin yang terlebih dulu harus dipisahkan (didegradasi) dari selulosa dan hemiselulosa. Selain itu, selulosa merupakan senyawa yang mempunyai bagian yang berstruktur kristal yang agak sulit didegradasi oleh mikroba atau enzim selulase. Salah satu faktor penting dalam seleksi bahan berlignoselulosa untuk dikonversi menjadi etanol adalah rasio selulosa terhadap lignin. Untuk memperoleh rendemen yang tinggi, harus dipilih bahan baku dengan kandungan selulosa dan hemiselulosa yang cukup tinggi, dan sebaliknya

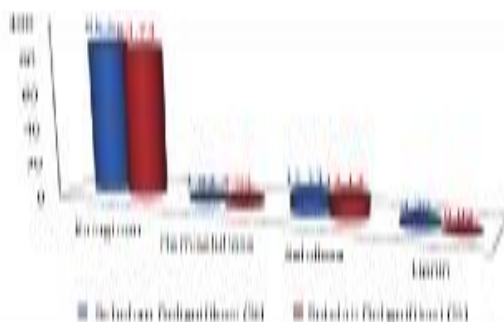
kandungan lignin harus rendah (Euis *et al.* 2010).

Analisis kadar lignin rumput laut jenis *Eucheuma cottonii* dari hasil penelitian Samsul Rizal (2005), melaporkan bahwa rumput laut jenis *Eucheuma cottonii* mengandung kadar abu 19,92 %, protein 2,80%, lemak 1,78 %, serat kasar 7,02 % dan mengandung karbohidrat yang cukup tinggi yaitu sekitar 68,48 %. Adanya lignin dalam bahan berselulosa akan menghambat aktifitas enzim yang terdapat pada mikroba dalam proses hidrolisis menjadi gula sederhana, sehingga untuk meningkatkan hidrolisis diperlukan delignifikasi untuk mendegradasi lignin dari struktur selulosa menggunakan bantuan senyawa katalis, salah satu caranya adalah dengan menggunakan katalis kimia berupa NaOH. Jalaluddin (2005) menyatakan bahwa penambahan konsentrasi katalis NaOH sampai 8% ternyata mampu meningkatkan kandungan selulosa dalam produksi pulp dari jerami, sehingga diperoleh hasil produksi optimum selulosa sekitar 91,4% dengan sisa lignin dalam pulp yang hanya mencapai sekitar 1,2% saja.

Pada penelitian ini kadar lignin yang diperoleh setelah delignifikasi adalah 0,02% atau terhidrolisis 59%. Semakin besar persentase lignin yang terhidrolisis, mengakibatkan semakin baik kondisi untuk rekasi enzimatik dalam produksi bioetanol, karena enzim yang dihasilkan oleh mikroba tidak mendapatkan halangan kontak untuk bereaksi dengan sisi aktif dari selulosa untuk memproduksi glukosa. Kadar selulosa sampel rumput laut *Eucheuma cottonii* setelah delignifikasi sebesar 12,13% dan untuk hemiselulosa 3,03%. Proses delignifikasi ini berhasil meghidrolisis ikatan 1,4 antara molekul monosakarida atau disakarida dengan molekul-molekul lignin. Kadar lignin, selulosa, hemiselulosa, karaginan sebelum dan setelah proses delignifikasi disajikan pada Tabel 1 dan Gambar 1.

Tabel 1. Kadar karaginan, hemiselulosa, selulosa dan lignin sebelum dan sesudah delignifikasi

	Sebelum delignifikasi	Setelah Delignifikasi
Berat sampel (a) gram	1,0044	1,0094
Berat residu (b) gram	0,1364	0,1234
Berat residu (c) gram	0,0038	0,0010
Berat abu (d) gram	0,0004	0,0008
Kadar Karaginan(%)	86,60	84,74
Kadar Hemiselulosa (%)	1,83	3,03
Kadar Selulosa (%)	11,11	12,13
Kadar Lignin (%)	3,39	0,02



Gambar 1. Pengaruh delignifikasi terhadap persentase kadar lignin, selulosa, hemiselulosa, karaginan sebelum dan setelah proses delignifikasi

Pada penelitian ini digunakan *A. niger* yang memiliki kemampuan untuk memproduksi β -glukosidase dan bekerja secara sinergis untuk menghasilkan enzim selulase yang dapat mengkonversi selebiosa yang telah terbentuk menjadi glukosa (Vilena,G,K dan Marcel,G,C. 2007). Mikroba *A. niger*, *S. cerevisiae* pada reaksi sakarifikasi dapat menghasilkan enzim glukoamilase yang dapat mengubah polisakarida menjadi gula (glukosa, galaktosa, manosa dan sebagainya) yang difermentasikan lebih lanjut oleh *Zymomonas mobilis* dan *Sacharomyces cerevisiae* menjadi etanol. Enzim glukoamilase merupakan enzim karbohidrase yang mengkatilasis pemecahan ikatan α (1-4) glikosidik pada polisakarida pati menjadi glukosa. Sementara *Zymomonas mobilis* menghasilkan enzim yaitu glukokinase dan fruktokinase yang mampu mengubah gula reduksi menjadi etanol (Purwoko, 2009) melalui 2-keto-3-deoksi-6-fosfoglukonat membentuk piruvat, kemudian piruvat oleh piruvat dekarboksilase diubah menjadi asetaldehida yang kemudian direduksi menjadi etanol (Syahrocni, 2014). Kandungan etanol tertinggi

sebesar 5,65 % yang terjadi pada kondisi pH 3,5 hari ke-7 (Tabel 2), hasil tersebut masih sesuai dengan konsentrasi bioetanol yang diperoleh dari proses fermentasi mencapai kadar 6-10% (Indyah N, 2005).

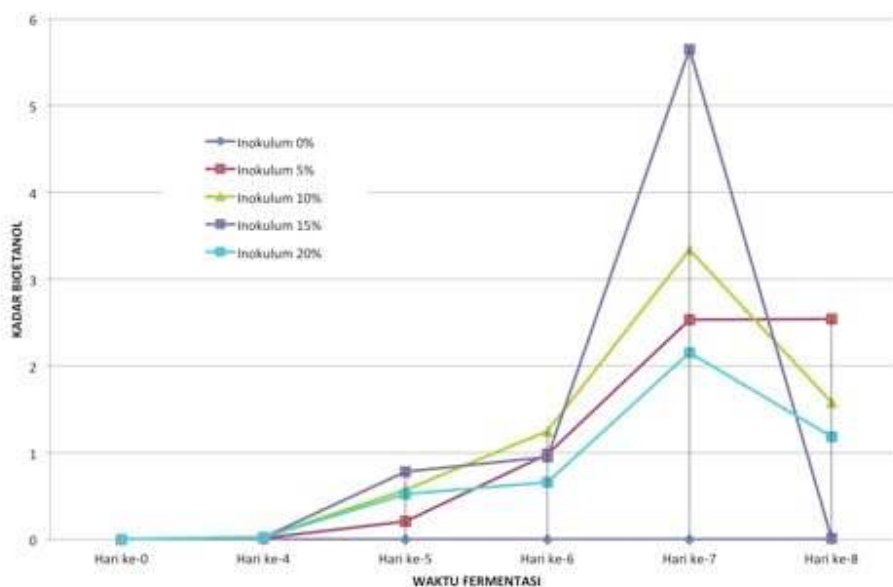
Pengaruh Konsentrasi Inokulum Mikroba Asosiasi terhadap Konsentrasi Bioetanol

Faktor faktor yang berpengaruh terhadap konsentrasi alkohol yang diproduksi dalam proses fermentasi antara lain; gula sebagai sumber energi untuk metabolisme mikroba yang pada akhirnya akan berpengaruh terhadap konsentrasi alkohol, konsentrasi inokulum mikroba asosiasi, lama fermentasi, suhu dan pH. Pada penelitian terdapat variabel konsentrasi inokulum (0 mL, 5 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, 25 mL), lama fermentasi (0 hari, 4 hari, 5 hari, 6 hari, 7 hari, 8 hari) yang ditunjukkan pada Tabel 2. Variasi konsentrasi inokulum didasarkan pada penelitian Kusumaningati, dkk (2013), yang menyatakan bahwa rentang konsentrasi yang sempit (6, 8, 10%) tidak memberikan hasil yang berbeda nyata.

Proses fermentasi dengan menggunakan konsentrasi inokulum 0% sebagai kontrol dapat dilihat grafik menunjukan posisi *stagnan* (Gambar 2) karena tidak ada produk fermentasi yang dihasilkan karena tidak ada mikroba yang ditambahkan. Pada fermentasi hari ke-4 sampai ke-7, bioetanol mulai terbentuk dan mengalami penurunan pada hari ke-8. Peningkatan kadar bioetanol berbanding lurus dengan pertambahan waktu fermentasi yang semakin lama disebabkan karena masih terdapat nutrisi yang ditambahkan pada medium fermentasi dan merupakan sumber nitrogen untuk pertumbuhan mikroba, sehingga sel mikroba dapat tumbuh dan membelah secara eksponensial sampai jumlah yang maksimal atau memasuki fase logaritma.

Tabel 2. Pengaruh konsentrasi inokulum dan waktu fermentasi terhadap kadar bioetanol

Konsentrasi Inokulum Mikroba Asosiasi	Jumlah Bioetanol yang dihasilkan (%) dalam waktu fermentasi					
	0 hari	4 hari	5 hari	6 hari	7 hari	8 hari
0%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5%	0,00	0,01	0,21	0,98	2,53	2,54
10%	0,00	0,03	0,57	1,25	3,34	1,58
15%	0,00	0,02	0,78	0,95	5,65	0,01
20%	0,00	0,02	0,52	0,66	2,15	1,18



Gambar 2. Pengaruh konsentrasi inokulum dan waktu fermentasi terhadap kadar bioetanol

Pada konsentrasi inokulum 10% dan 15% menunjukkan grafik peningkatan produksi bioetanol mulai hari ke-4 sampai hari ke-7 (Gambar 2) dimana terjadi pertumbuhan mikroba secara eksponensial sehingga terjadi peningkatan sekresi enzimatis oleh mikroba yang pada akhirnya dapat menghidrolisis karbohidrat menjadi glukosa dan selanjutnya dikonversi menjadi etanol. Penurunan konsentrasi produksi etanol pada hari ke-8 disebabkan karena proses degradasi baik enzimatis karbohidrat menjadi glukosa dan kemudian menjadi etanol oleh ketiga mikroba telah menghabiskan seluruh nutrisi yang tersedia dalam proses tersebut. Masalah ini ditambah lagi dengan ketiga mikroba telah memasuki periode kematian dipercepat, sehingga proses sekresi enzimatis semakin berkurang yang berdampak pada produksi etanol.

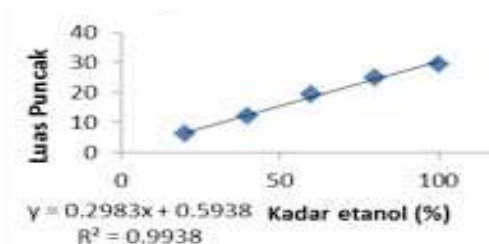
Penentuan Senyawa Bioetanol dengan Kromatografi Gas (KG)

Penentuan kadar etanol hasil fermentasi diawali dengan melakukan penentuan kurva standar etanol dengan deret konsentrasi etanol adalah sebagai berikut: 20%, 40%, 60%, 80% dan etanol absolut 100% (Tabel 3). Penentuan kadar bioetanol hasil fermentasi mikroba campuran pada hari ke-4, 5, 6, 7 dan 8 dilakukan berdasarkan data spektrum Kromatografi Gas (KG) dan kurva standar etanol (Gambar 3).

Spektrum KG bioetanol hasil fermentasi hari ke-4 (Gambar 4) menunjukkan adanya

5 komponen yaitu pada waktu retensi 0,715 menit; 1,052 menit; 2,468 menit; 2,623 menit dan 2,816 menit. Komponen utama terdapat pada waktu retensi 2,623 dengan luas area sebesar 5997425 yang dapat disimpulkan adalah merupakan senyawa etanol berdasarkan data spektrum etanol standard dan komponen yang lain merupakan senyawa pengotor. Konsentrasi bioetanol hasil fermentasi hari ke-4 diukur dengan memasukan nilai luas area yang diperoleh dari pengukuran ke dalam persamaan regresi linear yang membandingkan luas puncak dan kadar etanol standard.

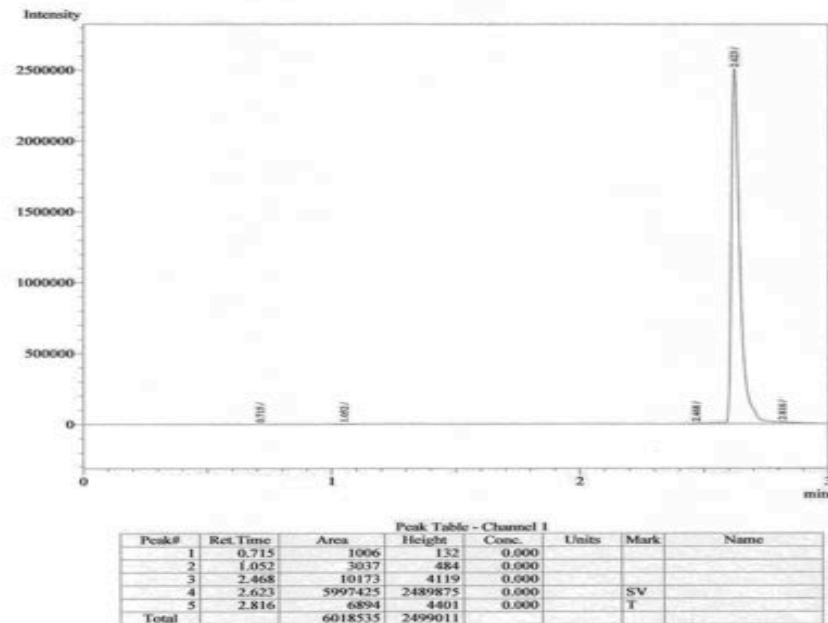
Konsentrasi bioetanol hasil fermentasi hari ke-4 sebesar 0,02%, hal ini diakibatkan karena mikroba asosiasi masih dalam fase lag atau fase adaptasi yaitu fase di mana mikroba melakukan penyesuaian sel dengan lingkungan, pembentukan enzim-enzim untuk mengurai substrat. Pada hari ke-4 diperkirakan campuran mikroba masih berkonsentrasi untuk beradaptasi untuk pertumbuhan sel sel penyusun dan pembentukan enzim pengurai.



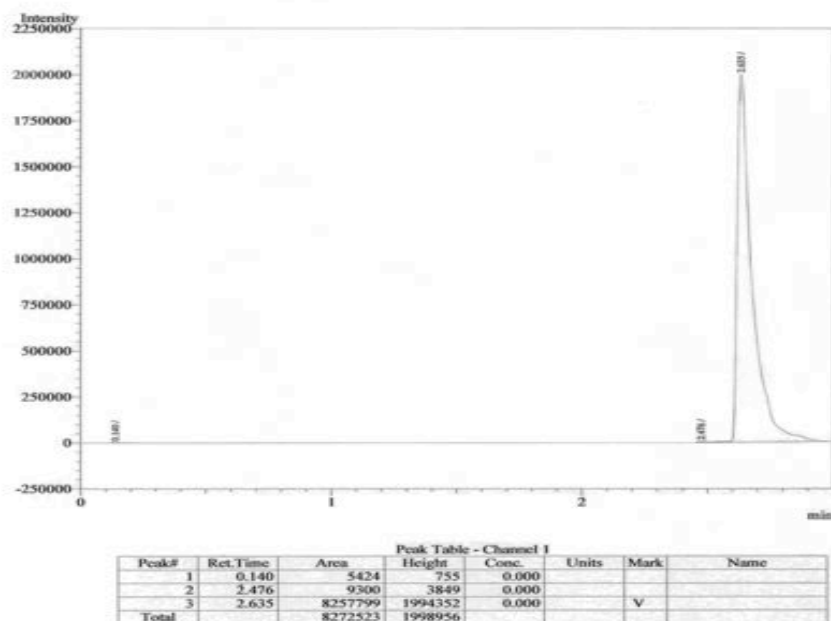
Gambar 3. Kurva Standar hubungan Luas Puncak dan Kadar Etanol Standar

Tabel 3. Komposisi Larutan Etanol Standar dan Pelarut Aquabides

No	Konsentrasi Etanol Standar (%)	Volume		Volume Injeksi (µL)	Luas Puncak
		Etanol Absolut	Akuabides		
1	20	0,2	0,8	1	61532401
2	40	0,4	0,6	1	122345197
3	60	0,6	0,4	1	194576884
4	80	0,8	0,2	1	250412950
5	100	1,0	0,0	1	295837554



Gambar 4. Kromatogram KG hasil fermentasi bioetanol hari ke-4



Gambar 5. Kromatogram KG hasil fermentasi bioetanol hari ke-5

Penelitian dilakukan dengan metode *solid saccharification fermentation* (SSF) dimana proses enzimatik pembentukan glukosa dan etanol berlangsung secara serempak dengan campuran mikroba yang sama. Pada hari ke-4 enzim glukamilase dan glukosidase belum terbentuk sehingga reaksi biokatalisis atau reaksi hidrolisis menjadi glukosa dan seterusnya menjadi etanol belum berlangsung.

Konsentrasi bioetanol hasil fermentasi pada hari ke-5 dan hari ke-6 adalah sebesar 0,78% dan 0,95%. Pada hari ke-5 dan ke-6 diperkirakan *Aspergillus niger*, *Zymomonas mobilis* dan *Saccharomyces cerevisiae* masih dalam fase akselerasi yaitu suatu kondisi di dalam pertumbuhan mikroba dimana terjadi proses pembelahan sel. Fase ini diperkirakan belum terjadi reaksi enzimatik untuk degradasi dan hidrolisis substrat karena enzim pengurai belum terbentuk.

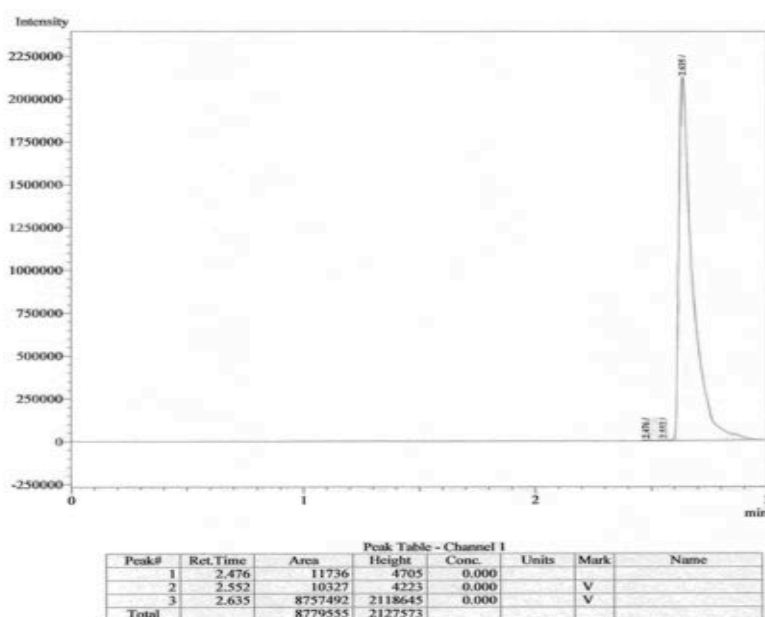
Kromatogram KG hasil fermentasi pada hari ke-5 (Gambar 5) menunjukkan adanya tiga komponen yang ada pada hasil fermentasi campuran mikroba yaitu pada waktu retensi 0,140 M, 2,467 M dan 2,635 M. Komponen senyawa pada Rt 2,63 merupakan komponen yang paling dominan dengan luas area 8257799 dan senyawa ini adalah etanol. Jumlah komponen yang terbentuk pada hari ke-5 mengalami pengurangan dibandingkan hari ke-4 membuktikan terjadinya reaksi degradasi.

Kromatogram KG hasil fermentasi pada hari ke-6 (Gambar 6) menunjukkan adanya tiga komponen yang ada pada hasil fermentasi campuran mikroba yaitu pada waktu retensi (Rt) 2,476 M, 2,552 M dan 2,635 M. Komponen

senyawa pada Rt 2,635 merupakan komponen yang paling dominan dengan luas area 8779555 dan senyawa ini adalah etanol. Jumlah komponen yang terbentuk pada hari ke-5 dan 6 tidak mengalami pengurangan, tetapi terjadi perbedaan yang sangat kecil dalam waktu retensi setiap komponen hal ini diakibatkan karena senyawa senyawa yang terbentuk merupakan senyawa alkohol. Dengan demikian telah terjadi reaksi degradasi enzimatik karena tidak terbentuknya komponen yang lain selain senyawa senyawa alkohol.

Pada hari ke-7 fermentasi asosiasi mikroba *Aspergillus niger*, *Zymomonas mobilis* dan *Saccharomyces cerevisiae* dalam substrat tepung rumput laut *Eucheuma cottonii* diperoleh konsentrasi bioetanol sebesar 5,65%. Konsentrasi bioetanol pada hari ke-7 merupakan konsentrasi bioetanol hasil fermentasi mikroba asosiasi yang tertinggi, karena pada waktu ini mikroba asosiasi berada pada fase eksponensial dimana terjadi peningkatan dalam jumlah sel dan aktivitas mikroba serta merupakan fase yang penting dalam pertumbuhan mikroba. Diperkirakan pada fase ini terjadi reaksi reaksi enzimatik untuk produksi bioetanol.

Kromatogram KG hasil fermentasi pada hari ke-7 (Gambar 7) menunjukkan adanya dua komponen yang ada pada hasil fermentasi campuran mikroba yaitu pada waktu retensi (Rt) 2,475 M dan 2,631. Komponen senyawa pada Rt 2,631 merupakan komponen yang paling dominan dengan luas area 16814248 dan senyawa ini adalah etanol.



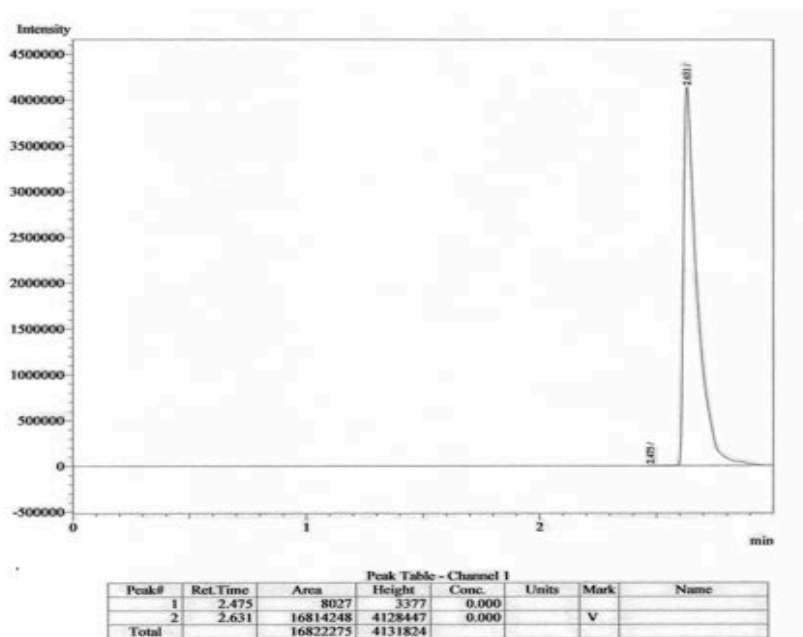
Gambar 6. Kromatogram KG hasil fermentasi bioetanol hari ke-6

Jumlah komponen senyawa yang terbentuk pada hari ke-7 mengalami pengurangan dan perbedaan yang sangat kecil dalam waktu retensi setiap komponen hal ini diakibatkan karena senyawa senyawa yang terbentuk merupakan senyawa alkohol. Dengan demikian telah terjadi reaksi degradasi enzimatis karena tidak terbentuk komponen lain selain senyawa senyawa alkohol.

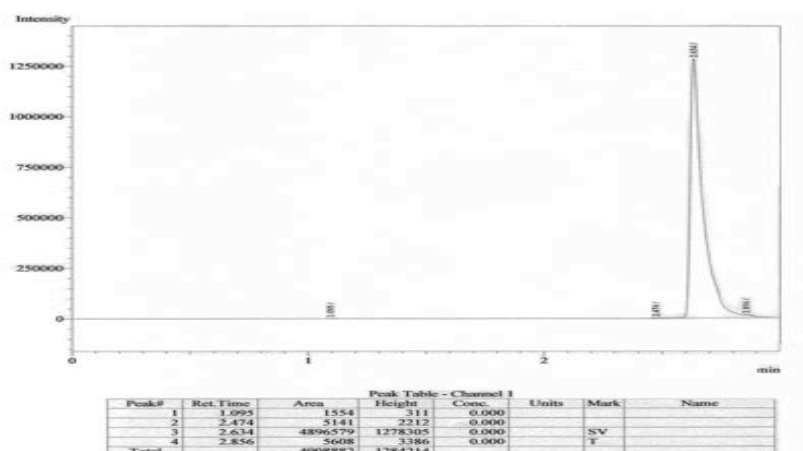
Luas area komponen pada Rt 2,631 pada hari ke-7 dua kali lebih besar dengan luas area komponen pada Rt 2,635 pada hari ke-6. Pada hari ke-8 fermentasi mikroba asosiasi *Aspergillus niger*, *Zymomonas mobilis* dan *Saccharomyces cerevisiae* dalam substrat tepung rumput laut *Eucheuma cottonii* diperoleh

konsentrasi bioetanol sebesar 0,01%. Terjadi penurunan yang sangat signifikan dalam produksi bioetanol hal ini diakibatkan karena mikroba sudah memasuki fase kematian dipercepat. Bioetanol yang dihasilkan pada fase sebelumnya akan bertindak sebagai racun terhadap mikroba sehingga mikroba-mikroba mengalami kematian.

Spektrum KG pada hari ke-8 (Gambar 8) terdiri dari 4 komponen senyawa dengan waktu retensi Rt 1,005 M; 2,474 M; 2,634 M dan 2,856 M. Komponen senyawa dengan Rt 2,634 merupakan komponen yang paling dominan dengan luas area 4896579. Komponen ini adalah senyawa etanol.



Gambar 7. Kromatogram KG hasil fermentasi bioetanol hari ke-7



Gambar 8. Kromatogram KG hasil fermentasi bioetanol hari ke-8

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pembuatan bioetanol dari rumput laut *Eucheuma cottonii* dengan menggunakan asosiasi mikroba *Aspergillus niger*, *Zymomonas mobilis* dan *Saccharomyces cerevisiae* dapat dilakukan dengan metode *simultaneous saccharification fermentation* (SSF). Perbedaan konsentrasi inokulum mikroba asosiasi dan waktu fermentasi berpengaruh terhadap kadar bioetanol yang dihasilkan. Kadar bioetanol tertinggi adalah 5,65% dihasilkan pada konsentrasi inokulum 15 % dengan waktu fermentasi 7 hari.

DAFTAR PUSTAKA

- Broto S. Kardono. 2010. *Teknologi Pembuatan Etanol Berbasis Lignoselulosa Tumbuhan Tropis untuk Produksi Biogasoline*. Laporan Akhir Program Intensif Peneliti dan Perekayasa LIPI. Serpong.
- ESDM. 2012. *Laju Eksplorasi Minyak Cadangan Indonesia Sangat Tinggi*.
<http://www.esdm.go.id/berita/migas.html>, diakses tanggal akses: 6 Juni 2012
- Euis H, Djumali M, Titi C S, Ono S, Bambang P. 2010. Pemanfaatan Biomassa Lignoselulosa Ampas Tebu Untuk Produksi Bioetanol. *Jurnal Litbang Pertanian*, 29(4).
- Gouveia, L, and A.C Oliveira. 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production. *J Ind. Microbiol Biotechnol*. 2009 Feb;36(2):269-74.
- Hamelinck, C. N, Hooijdonk, G. V, Faaij, and A. P. 2005. Etanol from Lignocellulosic Biomass: Techno Economic Performance in Short, Middle, and Long-Term. *Biomass and Bioenergy*, 28(4), 384–410.
- Harvey, M, Pilgrim, S. 2010. Battles Over Biofuels in Europe: NGOs and The Politics of Markets. *University of Essex, Sociological Research Online*, 15(3):4-16
- Indyah N. 2005. Prospek Pengembangan Biofuel Sebagai Substitusi Bahan Bakar Minyak dan Teknologi Proses Produksi Bioetanol. *Jurnal Teknologi Proses*.
- Jalaludin, S.R. 2005. Pembuatan Pulp dari Jerami Padi dengan Menggunakan Natrium hidroksida. *Jurnal Sistem Teknik Industri*. 6 (22-26).
- Kusumaningati A. Mutiara, S. Nurhatika, dan A. Muhibidin. 2013. Pengaruh Konsentrasi Inokulum Bakteri *Zymomonas mobilis* dan Lama Fermentasi Pada Produksi Etanol dari Sampah Sayur dan Buah Pasar Wonokromo Surabaya. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*, 2(2) : 218-225.
- Mahyati, A. R. Patong, M.N. Djide, P. Taba, and M. Saleh. 2013. Produksi Bioetanol dari Tongkol Jagung (*Zea mays* L) Menggunakan Mikroba Campuran. *Prosiding SNTI ATI 2013*: 332-335.
- Mosier T, and L. Nathan. 2005. Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. *Bioresource Technology*, 96, pp. 673–686.
- Niken L, W dan D,A Bambang,.2014. Pemanfaatan microwave dalam proses pretreatment degradasi lignin ampas tebu (bagasse) pada produksi bioetanol. *Jurnal Teknologi Pertanian*, 15 (1):1-6.
- Purwoko, T. 2009. *Fisiologi Mikroba*. Bumi Aksara, Jakarta
- Rahmanto, L, M dan Ambarwati. 2011. Pembuatan Bioetanol dari bagase dengan Hidrolisis Enzim, dan Fermentasi menggunakan *Saccharomyces Cerevisiae* dan *Zymomonas Mobilis*, *Jurusan Kimia, FMIPA Institut Teknologi Sepuluh Nopember*. Surabaya, Indonesia.
- Sinuraya, E, A. 2014. *Produksi substrat fermentasi bioetanol (biofuel) dari makroalga Eucheuma cottonii* melalui hidrolisis menggunakan asam. Skripsi Teknologi Industri, Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gajah Mada.
- Syachroni, 2014. *Pengaruh Kombinasi Starter Kultur Lactobacillus Plantarum dan Lactobacillus Acidophilus terhadap Karakteristik Mikrobiologis dan Kimiawi Pada Minuman Fermentasi*. Skripsi Program Studi Teknologi Hasil Ternak, Jurusan Produksi Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin, Makassar Indonesia.
- Villena, G, K. and G. C. Marcel 2007. Production of lignocellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* biofilms at variable water activities. *Electronic Journal of Biotechnology Chile*: 10 (1) :124-140.